

VU Research Portal

Something To Chew On

Renders, G.A.P.

2017

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Renders, G. A. P. (2017). *Something To Chew On: The neverending CT story of bone and cartilage*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl



ALGEMENE SAMENVATTING

In een gezond gewricht werken gewrichtskraakbeen en subchondraal bot samen om het krachten spel in het gewricht goed te verdelen. Daarom is de integriteit van beide weefsels belangrijk voor een adequate functie. Als één van deze elementen uit balans raakt, zal het onvermijdelijk een cascade van fysiologische, biochemische en biomechanische reacties veroorzaken in de andere gewrichtscomponenten omdat het systeem zoekt naar een nieuwe balans. De intieme interactie tussen de twee weefsels komt voort uit de nauw geassocieerde ontstaanswijze van beide. Bot en kraakbeen ontstaat tijdens de ontwikkeling uit één weefsel en zijn naast elkaar gedifferentieerd in twee aparte weefsels. Het is algemeen geaccepteerd dat de wederzijdse feedback tussen deze weefsels nodig is tijdens hun verdere specialisatie op het gebied van ieders unieke rol en functies in een gewricht. Daarom zijn bot en kraakbeen in een volgroeid gewricht onderling van elkaar afhankelijk en alleen in staat om de verwachte biomechanische functies uit te voeren dankzij wederzijdse ondersteuning van elkaar op het niveau van macro-structuur tot aan micro-structuur. Aanvullend, deze intieme relatie tussen bot en kraakbeen omvat meerdere routes van interactie; waarvan er vele gerelateerd zijn aan regulatie van metabolisme en remodeleringsmechanismen van deze weefsels.

Onze belangrijkste onderzoeksvragen waren: Is μ CT een bruikbare techniek voor kwantitatief botonderzoek in het kaakgewricht? Is een biomechanisch model gebaseerd op μ CT bruikbaar voor osteoarthritis (OA) onderzoek in het kaakgewricht? Is μ CT bruikbaar voor kraakbeen analyse in het kaakgewricht van een menselijk of muizen model? Door het beantwoorden van deze vragen hopen wij bij te dragen aan het vinden van nieuwe methodes en manieren om OA ontwikkeling beter te begrijpen zodat er efficiëntere behandelingen ontworpen kunnen worden. Toekomstig OA onderzoek kan zich bijvoorbeeld richten op de complexe interacties tussen verschillende weefsels in OA progressie gebruikmakend van de technieken beschreven in dit proefschrift. Meer focus op de rol van het subchondrale bot in de vroege fases van deze ziekte, lijkt van belang.

Hoofdstuk 2 beschrijft de applicatie van de conventionele μ CT methode op de mandibulaire component van het menselijke kaakgewricht voor kwantitatieve metingen van bot structuur parameters (bijv. corticale en trabeculaire morfologie) en materiaal parameters (bijv. mineralisatiegraad en mate van mineraalverdeling). De dimensies van het kaakgewricht zijn uitermate geschikt voor dit soort onderzoek en daarom werd dit gewricht gekozen als basisgewricht voor het onderzoek. In onze studie werd voor het eerst de mineralisatiegraad en de mate van mineraalverdeling onderzocht in het corticale en trabeculaire bot van de menselijke kaakkop (**Hoofdstuk 2a**). De mineralisatiegraad in de kaakkop kan een weerspiegeling zijn van leeftijd en mate van remodelering van het botweefsel. Kwantificering van deze mineralisatiegraad faciliteert een beter begrip van het mogelijke effect op adaptieve remodelering van mineralisatie in

de kaakkop van een gezond en ziek gewricht. Dit heeft mogelijk consequenties voor de mechanische eigenschappen van het bot. Een conventioneel μ CT systeem werd gebruikt om mineralisatiegraad te bepalen. De gemiddelde mineralisatiegraad was hoger in het corticale bot in vergelijking tot het trabeculaire bot. Er werden ook verschillen gevonden tussen de verschillende gebieden van het corticale bot. De variatie van mineralisatiegraad was significant groter in de anterieure cortex dan in de posterieure en subchondrale cortex. Dit kan duiden op een grotere mate van heterogeniteit van de mineralisatiegraad in de anterieure cortex. Binnen de cortex nam de mate van mineralisatie toe met afstand tot de corticale kanalen. Overeenkomstig, de mineralisatiegraad in het trabeculaire bot nam toe van oppervlak naar de kernen van de botbalken. Op het biomechanische niveau suggereert een verschil in mineralisatiegraad tussen trabeculair en corticaal bot, een verschil tussen de elasticiteitsmoduli (Young's moduli: mate van stijfheid en starheid van een materiaal).

In dit proefschrift hebben we hoge resolutie visualisatie van het corticale porositeit netwerk in 3D kunnen weergeven. Daarnaast hebben we kwantitatieve informatie van dit netwerk kunnen verzamelen met behulp van conventionele μ CT (**Hoofdstuk 2b**). We waren in staat om de corticale porositeit te onderzoeken in relatie tot de mineralisatiegraad om zo meer informatie te verkrijgen over de belangrijkste richting van trekbelasting en drukkracht. Kwantificering van porositeit en mineralisatiegraad van botweefsel verdiept het begrip van de mogelijke effecten op adaptieve bot remodelering en de mogelijke consequenties voor mechanische eigenschappen van bot. De corticale kanalen in de subchondrale cortex van de kaakkop bleken georiënteerd in mediolaterale richting, in de anterieure en posterieure cortex was dit in superoinferieure richting. Corticale porositeit (gemiddeld 3,5 %) was niet significant verschillend tussen de verschillende corticale regio's. Er was een significante correlatie met de diameter en aantal corticale kanalen, maar niet met corticale mineralisatiegraad. In het trabeculaire bot (gemiddeld porositeit 79,3 %) was een significante negatieve correlatie aanwezig tussen oppervlakte gebied van de trabeculae en mineralisatiegraad; deze correlatie was niet evident tussen oppervlakte gebied van de corticale kanalen en de corticale mineralisatiegraad. Er was geen relatie aanwezig tussen trabeculaire en corticale porositeit of tussen trabeculaire en corticale mineralisatiegraad, dit suggereert dat adaptieve remodelering onafhankelijk is en verschillend in trabeculair en corticaal bot. Wij concludeerden dat de belangrijkste richting van trekbelasting en drukkracht voornamelijk in mediolaterale richting is in de subchondrale cortex en superoinferieur in de anterieure en posterieure cortex. Verder is de mate van remodelering groter in het trabeculaire bot in vergelijking tot het corticale bot in de kaakkop; in trabeculair bot is variatie in de mate van remodelering gerelateerd aan het beschikbare oppervlak van de botbalken.

In **Hoofdstuk 3** wordt het gebruik van μ CT-gebaseerde Finite Element (FE) analyses beschreven en bediscussieerd. Deze FE analyses worden gebruikt om de invloed van intratrabeculaire mineralisatie op verschillende mechanische output parameters (bijv. elasticiteitsmodulus en intratrabeculaire patronen van trekbelasting en drukkracht) te testen in het trabeculaire bot van de menselijke kaakkop. Door dagelijkse belasting ondervindt het trabeculaire bot vervormingen (dit is, drukkracht) die leiden tot trekbelasting in het botweefsel. Wanneer trekbelasting en/of drukkracht afwijken van de normale waarden, zal het remodeleringproces leiden tot adaptatie van de botarchitectuur en mineralisatiegraad om effectief om te gaan met het veranderende krachtspel. Van de algemene mechanische eigenschappen van botweefsel wordt gedacht dat deze afhankelijk zijn van de verdeling en de hoeveelheid mineraal. Om deze reden was het doel van onze studie in **Hoofdstuk 3a** om te onderzoeken hoe mineralisatie heterogeniteit de biomechanische eigenschappen van het trabeculaire bot in de menselijke kaakkop kan beïnvloeden. Er werden twee sets FE modellen gemaakt van trabeculaire volumes; de weefselstijfheid werd geschaald naar de lokale mineralisatiegraad zoals gemeten met het μ CT systeem (heterogeen model) of er werd aangenomen dat deze homogeen was (homogeen model). Compressie en schuiftesten werden gesimuleerd om de algemene elasticiteitsmodulus van beide modellen te bepalen (heterogeen model versus homogeen model). Het in acht nemen van de mineralisatiegraad zorgde voor afname van de algemene elasticiteitsmodulus en schuifmodulus met maximaal 21 % in vergelijking tot het homogeen model. De algemene moduli in het heterogeen model waren significant gecorreleerd met hoeveelheid bot volume en mineralisatiegraad van het bot. Er werd geconcludeerd dat het niet in acht nemen van deze mineralisatie heterogeniteit kan leiden tot aanzienlijke overschatting van algemene elasticiteitsmoduli in FE modellen.

Onze kennis van de invloed van mineralisatie variaties (dit is, mineralisatie heterogeniteit) op het biomechanische gedrag van bot op het trabeculaire niveau is beperkt. Om deze reden was het doel van **Hoofdstuk 3b** om te onderzoeken hoe deze materiaaleigenschap de intratrabeculaire verdeling van rekbelasting en drukkracht in het menselijke trabeculaire bot kan beïnvloeden. De invloed van intratrabeculaire mineralisatie heterogeniteit werd geanalyseerd door vergelijking van de eerder genoemde biomechanische modellen. Er werden interessante effecten gevonden als er werd gekeken naar intratrabeculaire verdelingen van rekbelasting en drukkracht. In het homogeen model werden de hoogste trekbelastingen gevonden aan het oppervlak met een significante afname naar de kern van de botbalken. Hogere oppervlakkige trekbelastingen kan betekenen dat er een hogere kans op breukrisico is van de botbalken. In het heterogeen model was de verdeling anders. Een significante toename van trekbelasting met toenemende afstand van het trabeculaire oppervlak werd gevonden gevolgd door een significante afname naar de kern van de botbalken. Dit suggereert

het buigen van de botbalken tussen compressie. In beide modellen werd een afname in drukkracht voorspeld van oppervlak naar kern, dit is overeenkomstig met trabeculair buigen. Wanneer er rekening werd gehouden met de mineralisatie heterogeniteit, waren de intratrabeculaire patronen van rekbelasting en drukkracht die voorspeld werden meer overeenkomstig met het te verwachten biomechanische gedrag zoals gebaseerd op mineralisatie variaties in de botbalken. Onze gegevens geven aan dat mineralisatie heterogeniteit niet verwaarloosbaar is bij het uitvoeren van biomechanische studies op het gebied van bijvoorbeeld (lange termijn of dosis afhankelijke) effecten van anti-resorptie behandelingen.

Hoofdstuk 4 beschrijft verschillende implicaties van een hoge dosis bisfosfonaat behandeling op botweefsel parameters (bijvoorbeeld mineralisatiegraad, trabeculaire en corticale dikte) in het kniegewricht versus kaakgewricht en onderkaak versus bovenarm in een muizenmodel met behulp van μ CT assessment en histologie technieken. Bisfosfonaten (BF) zijn bot-anti-resorptie middelen die traditioneel gebruikt worden op relatief grote schaal voor behandeling van metabolische botziekten en op kleinere schaal voor behandeling van kanker in bot. Onderzoek naar de effecten van BF behandeling op gezonde, in plaats van ongezonde, dieren kan meer inzicht geven in de basale mechanismen van bisfosfonaten en hun effecten op verschillende bot regio's. In **Hoofdstuk 4a** hadden we als doel om het effect van BF behandeling op het knie- en kaakgewricht van de muis te onderzoeken. Aan het begin en aan het einde van een behandeling met zolendroninezuur (ZZ) gedurende één, drie of zes maanden, werd er een bot assessment uitgevoerd met μ CT en histologie. Uit onze resultaten kwam naar voren dat, in het kniegewricht een ZZ behandeling een toename gaf van mineralisatiegraad, botvolume, en dikte van botbalken maar geen invloed had op de dikte van de cortex. In zowel de controle als in de experimentele groep werd een hogere mineralisatiegraad in het trabeculaire bot gevonden vergeleken tot het corticale bot. Wat nog nooit eerder waargenomen in het kaakgewricht was, was dat ZZ behandeling in dit gewricht resulteerde in een bot regio specifieke verandering van mineralisatie; een significant tijdsafhankelijke hoger mineralisatiegraad die duidelijk aanwezig was in het subchondrale bot. MicroCT beelden laten de aanwezigheid van mineralen in dit gebied zien en met behulp van histologie konden we aantonen dat deze regio niet bestaat uit volwassen botweefsel maar uit een kraakbeenachtig weefsel. Onze data duiden op mogelijke regio-afhankelijke negatieve bijwerkingen, bijvoorbeeld op verstoring van normale kaakop ontwikkeling onder de invloed van bisfosfonaat.

In **Hoofdstuk 4b** hebben we onderzocht of *in vivo* blootstelling aan bisfosfonaten verschillende effecten kan hebben op botafbrekende cellen (osteoclasten) in de pijpbeenderen en in de kaak. Tevens is er gekeken naar de mate van botomzet in deze

verschillende botten. Er werd gebruik gemaakt van hetzelfde dierexperiment zoals beschreven in **Hoofdstuk 4a**. De effecten op het aantal osteoclasten, bot mineralisatie en botvorming werd gemeten in pijpbeenderen en kaak. Lange termijn behandeling van ZZ zorgde voor afname van het aantal beenmergcellen in de kaak, zonder beïnvloeding van het aantal beenmergcellen in de pijpbeenderen. Zolendroninezuur behandeling zorgde niet voor afname van het aantal osteoclasten *in vivo*. Toch zorgde BF voor toename van botvolume en mineralisatiegraad in zowel pijpbeenderen als kaakbot. Na zes maanden behandeling werd een remming van botvorming waargenomen in pijpbeenderen maar niet in het kaakbot. Daarbij werd onverwachts wortelresorptie van de molaren gevonden die gemedieerd werd door actieve osteoclasten. Onze bevindingen geven meer inzicht in bot-regio-afhankelijke effecten van bisfosfonaten en in de etiologie van osteonecrose van de kaak. Wij hebben kunnen demonstreren dat bisfosfonaten de osteoclast activiteit aan de wortels van molaren kan stimuleren.

Hoofdstuk 5 beschrijft de introductie van een nieuw μ CT techniek genaamd EPIC- μ CT. Beide technieken kunnen *ex vivo* toegepast worden in zowel een menselijk als muizen kaakgewricht voor 3D assessment van bot en kraakbeen morfologie. Het temporomandibulaire gewricht (TMG) is vatbaar voor ontwikkeling van osteoartritis. Meer gedetailleerde kennis van het ontstaan van de ziekte is essentieel om meer inzicht te krijgen van deze ziekte in het kaakgewricht (TMG-OA). Het is van belang om een gestandaardiseerde en betrouwbare 3D methodiek te hebben waarmee we in staat zijn om gedetailleerde assessment van bot en kraakbeen in gezonde en zieke gewrichten te bewerkstellingen. Het doel was om de toepasbaarheid van een contrast-versterkte μ CT techniek te bepalen voor gebruik in *ex vivo* onderzoek in muizen en menselijk TMG. Equilibrium Partitioning of an Ionic agent via μ CT (EPIC- μ CT) werd al eens eerder toegepast voor kraakbeen analyse in het kniegewricht. De methode werd *ex vivo* toegepast op het muizen TMG en aangepast voor het menselijke TMG. EPIC- μ CT (30 minuten inwerkingstijd) werd toegepast op muizen kaakkoppen en 3D beelden onthulden dat gemiddelde kraakbeen diktemetingen overeenkomstig waren met histomorfometrische metingen. Voor menselijke gezonde en OA-aangedane kaakkoppen werd het protocol aangepast met een inwerkingstijd van één uur. Driedimensionale beelden onthulden een significant dikkere kraakbeenlaag in gewrichten met vroege tekenen van OA in vergelijking tot gezonde gewrichten. Daaropvolgend werd een significant dunner kraakbeenlaag gevonden in menselijke kaakkoppen met late tekenen van OA. De EPIC- μ CT techniek bleek effectief voor de *ex vivo* analyse van 3D kraakbeen morfologie in kaakkoppen van muis en mens en kan bijdragen aan bot-kraakbeen interactie onderzoek in TMG-OA.

In dit proefschrift werden conventionele en contrast-versterkte μ CT technieken *ex*

vivo toegepast op het complete menselijke kaakgewricht. De combinatie van beide bekrachtigende beeldvormende technieken is veelbelovend om een meer fundamenteel onderbouwd begrip te vormen van gezonde en osteoartritis aangedane gewrichten omdat het de visualisatie van zowel bot als kraakbeen toelaat. De combinatie van beide methodes kan in de toekomst ook zorgen voor meer mogelijkheden om het kraakbeen-bot complex als geheel te bestuderen. De mechanische interactie tussen beide onderdelen van het gewricht en het dynamische krachtspel van een gewricht tijdens dagelijkse functie dan wel langdurig overbelasting kunnen centrale onderwerpen zijn. De dimensie van het gewricht tijdens alle stadia van ontwikkeling, stellen ons in staat om de fijne architectuur van zowel subchondraal als trabeculair bot te onderzoeken met behulp van μ CT technieken zonder verstoring van de volledige integriteit van het gewricht. Een doel van deze benadering is om te achterhalen/voorspellen hoe veranderingen van het subchondrale en trabeculaire bot (ten gevolge van overbelasting) in het gewricht leiden tot abnormale botstructuur veranderingen, zoals in osteoarthritis. Een tweede doel kan zijn om te voorspellen hoe veranderingen in belasting van het articulaire kraakbeen gerelateerd zijn aan de vereiste veranderingen om het kraakbeen te onderhouden.

Met μ CT-gebaseerde biomechanische computermodellen, die wij kunnen maken, is het mogelijk om de biomechanische interactie tussen bot en kraakbeen te voorspellen en te kijken naar de gevolgen van deze interactie in gezonde en osteoartritis aangedane gewrichten. Aanvullend kan een dierexperiment worden gebruikt om experimenteel geïnduceerde botveranderingen te onderzoeken door de invloed van specifieke botveranderingen op het kraakbeen in zowel knie- als kaakgewricht te bepalen. De combinatie van beide μ CT technieken in een dierexperiment kan ervoor zorgen dat we onderzoek kunnen doen naar de invloed van specifieke botveranderingen op het kraakbeen *ex vivo*. Onze data kunnen gebruikt worden om de volgende hypothese te testen: Botveranderingen gaan vooraf aan kraakbeenveranderingen en/of -schade in de ontwikkeling van osteoartritis. Met de resultaten van dit proefschrift hopen wij bij te dragen aan de implementatie van nieuwe methodes en manieren om meer te begrijpen van de ontwikkeling van osteoartritis, en het ontwerpen van effectievere behandelingen.

De resultaten beschreven in dit proefschrift leiden tot de volgende algemene conclusies:

- De mate van het dagelijkse krachterspel in botweefsel beïnvloedt de variaties van mineralisatiegraad en corticale porositeit, daarom kan remodelering een behulpzaam gereedschap zijn voor botweefsel om adaptaties te ondergaan passend bij dit krachterspel.
- Een meer specifieke input voor een biomechanisch model zal leiden tot een meer specifieke output en uitkomst van dit model. Afhankelijk van de gekozen onderzoeksvraag dient er een keuze te worden gemaakt welke variabele gekozen wordt.
- Reacties op hoge-dosis bisfosfonaat behandeling zijn bot-regio-afhankelijk (kaakbot versus pijpbeenderen) en kunnen verder een mogelijk en onbekend schadelijk effect hebben op het kaakbot.
- De EPIC- μ CT techniek is effectief voor *ex vivo* 3D analyse van bot en kraakbeen morfologie in kaakgewricht van muis en mens en is mogelijk bruikbaar voor bot-kraakbeen-interactie onderzoek in kaakgewricht osteoarthritis.

